

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/22680 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/47**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/10364**

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. September 2001 (07.09.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 45 591.3 15. September 2000 (15.09.2000) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **PFIZENMAIER, Klaus [DE/DE]; Seehausstrasse 7, 75233 Tiefenbronn (DE). WAJANT, Harald [DE/DE]; Sonnenbühl 2, 70771 Leinfelden-Echterdingen (DE).**

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MOOSMAYER, Dieter [DE/DE]; Zechliner Strasse 6, 13359 Berlin (DE). WÜEST, Thomas [CH/CH]; Rosenstrasse 46, CH-8953 Dietikon (CH).**

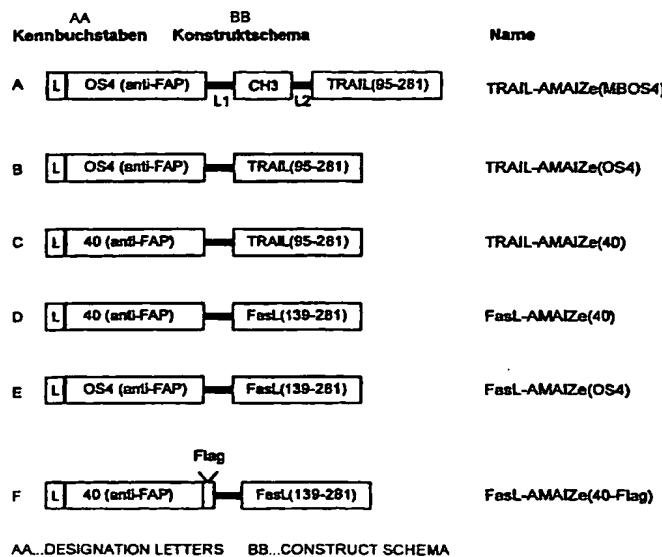
(74) Anwälte: **GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstr. 8, 80333 München (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SITE-SPECIFIC, ANTIBODY-MEDIATED ACTIVATION OF PROAPOPTOTIC CYTOKINE: AMAICE (ANTIBODY-MEDIATED APOPTOSIS INDUCING CYTOKINE)

(54) Bezeichnung: ORTSSPEZIFISCHE, ANTIKÖRPERVERMITTELTE AKTIVIERUNG PROAPOPTOTISCHER ZYTOKINE: AMAIze (ANTIBODY-MEDIATED APOPTOSIS INDUCING ZYTOKINE)



WO 02/22680 A2

(57) Abstract: The invention relates to antibody-cytokine fusion proteins having proapoptotic and immunomodulating properties, however, a priori having a specific bioactivity in the cytokine portion that is very low or limited to certain receptor subtypes. These reagents first deploy the full biological action over the corresponding cytokine receptor(s) after an antibody-mediated binding of the fusion protein to a specific, cell membrane-expressed target molecule. By appropriately selecting the antibody specificity, the cytokine activity is directed at the tissue to be treated, e.g. tumor tissue, and a therapeutic agent can be produced, which is specifically matched to/optimized for the respective indication/tumor entity.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine mit proapoptotischen und immunmodulierenden Eigenschaften, aber a priori sehr niedriger bzw. auf bestimmte Rezeptorsubtypen eingeschränkter spezifischer Bioaktivität im Zytokinanteil. Diese Reagenzien entfalten erst nach Antikörper-vermittelter Bindung des Fusionsproteins an ein spezifisches, zellmembranexprimierte Zielmolekül die volle biologische Wirkung über den/die entsprechenden Zytokinrezeptoren. Durch geeignete Auswahl der Antikörperspezifität wird die Zytokin-Aktivität auf das zu behandelnde Gewebe, z.B. Tumorgewebe, gerichtet und es kann ein auf die jeweilige Indikation/Tumorentität spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden.

5

10

**Ortsspezifische, antikörpervermittelte Aktivierung
proapoptotischer Zytokine:
AMAIZe (Antibody-Mediated Apoptosis Inducing Zytokine)**

15

Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, welche als solche biologisch inaktiv oder wenig aktiv sind und erst durch ortsspezifische und antikörpervermittelte Bindung entsprechend aktiviert werden, enthaltend eine Region, welche ein Peptidlinker ist, weiter enthaltend eine Antikörper- bzw. eine davon abstammende Region, die ein spezifisches Molekül auf einer Zelloberfläche selektiv erkennt und weiter enthaltend ein Zytokinanteil, der für sich alleine genommen biologisch inaktiv bzw. nur eingeschränkt aktiv ist. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, den Polypeptiden zugrundeliegende Nukleinsäuresequenzen, Vektoren, die diese erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenzen enthalten, mit erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenzen oder Vektoren transfizierte Zellen, Verwendungen erfindungsgemäßer Gegenstände zu therapeutischen Zwecken und Zusammensetzungen, enthaltend erfindungsgemäße Gegenstände.

Zytokine, bspw. Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, bspw. TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand), auch Apo2L genannt (Wiley et al. (1995), Immunity 6: 673-682, Pitti et al. (1996) J Biol Chem 271: 12687-12689), und bspw. FasL zeigen in in vitro Untersuchungen eine starke apoptotische Wirkung auf viele

Tumorzellen tierischen und menschlichen Ursprungs. Im Falle von TRAIL scheint es so zu sein, dass nicht maligne Zellen nicht beeinträchtigt werden. In den untersuchten präklinischen Tiermodellen (Maus, Affe) wurden darüber hinaus keinerlei Anhaltspunkte für eine akute Toxizität oder andere systemische

5 Nebenwirkungen von TRAIL, die als therapiebegrenzend anzusehen wären, festgestellt (Walczak et al. (1999) Nat Med 5:157-163, Ashkenazi et al. (1999) J Clin Invest 104: 155-162). Neuere in vitro Untersuchungen an primären humanen Hepatozyten zeigten allerdings eine starke zytotoxische Wirkung am Beispiel eines rekombinant hergestellten TRAIL-Produktes bzw. von membranständigem

10 TRAIL der natürlich vorkommenden Form dieses Zytokins (Jo et al. (2000) Nat Med 6: 564-567, Ichikawa et al. (2001) Nat Med 7: 954-960). Damit ist eine direkte klinische Anwendung der bisher vorliegenden Zytokine, bspw. rekombinanter TRAIL-Moleküle, welche die Wirkung des membranständigen TRAIL vollständig mimikrieren, ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde auch für

15 das verwandte Molekül FasL (Ligand des Fas-Rezeptors (Fas, CD95)), dem Prototyp apoptotischer Zytokine, eine klinische Anwendung a priori aus Sicherheitsgründen unterlassen, da agonistische Antikörper gegen seinen Rezeptor, Fas, in vivo extrem hepatotoxisch sind (Ogasawara et al. (1993) Nature 364: 806-809). Schließlich wurde auch gezeigt, dass FasL in löslicher Form

20 praktisch im Unterschied zu seiner membranständigen Form keine Bioaktivität besitzt (Schneider et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 1205-1213).

Damit sind die nach dem Stand der Technik verfügbaren Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie entweder auf Grund mangelnder Bioaktivität oder extremer

25 Toxizität zur therapeutischen Anwendung, bspw. zur Behandlung von Tumoren, nicht oder nur sehr begrenzt (z.B. im Falle von TNF unter sog. „isolated limb perfusion“ Bedingungen) einsetzbar.

Der vorliegenden Erfindung liegt nunmehr die Aufgabe zugrunde, die

30 Zytokinwirkung gerichtet und gewebs- bzw. zellspezifisch zu entfalten und damit unerwünschte, u.U. systemische Nebenwirkungen auf nicht zum Zielgewebe

gehörigen Geweben/Zellen bei einer klinischen Anwendung zu vermeiden oder zumindest stark einzuschränken.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Gegenstände der Ansprüche 1,

5 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18 gelöst. Hierbei liegt der vorliegenden Erfindung die Tatsache zugrunde, dass natürlicherweise membranständig vorkommende Zytokine, wenn sie vom Organismus in eine lösliche, der extrazellulären Domäne entsprechende Form proteolytisch prozessiert werden, entweder biologisch gänzlich inaktiv oder nur noch eingeschränkt, z.B. auf bestimmten

10 Membranrezeptor-Subtypen, wirksam sind. Dies gilt auch für rekombinant hergestellte Derivate, die der extrazellulären Domäne des jeweiligen Liganden entsprechen. Erfindungsgemäße Erkenntnis ist es, dass ein derart inaktives/eingeschränkt aktives Zytokin durch bspw. Antikörper-vermittelte spezifische Bindung an ein zellmembranständiges Antigen wieder (volle)

15 biologische Wirksamkeit erlangt und zwar gegenüber der Zielzellen selbst wie auch gegenüber benachbart liegenden Zellen, sofern diese jeweils die entsprechenden Zytokinrezeptoren für das eingesetzte Antikörper-Zytokin-Fusionsprotein exprimieren.

20 Damit werden in einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfindungsgemäß Polypeptide zur Verfügung gestellt, die (i) einen Abschnitt (1) mit einer biologischen Aktivität für ein spezifisches Zielmolekül, (ii) einen N-terminal von Abschnitt (1) gelegenen Abschnitt (2), welcher ein Peptidlinker ist, und (iii) einen Abschnitt (3), welcher ein weiteres spezifisches Zielmolekül auf

25 einer Zelloberfläche selektiv erkennt, enthalten. Hierbei liegt Abschnitt (3) am N-Terminus eines erfindungsgemäßen Polypeptids, mit zunächst C-terminal nachfolgendem Abschnitt (2) und einem weiter C-terminal angesiedelten Abschnitt (3). Derartige erfindungsgemäße Polypeptide (= erfindungsgemäße Fusionsproteine, = erfindungsgemäße Konstrukte) sind ohne ortsspezifische

30 und/oder selektive Bindung des Abschnitts (3) an das Zielmolekül biologisch inaktiv/eingeschränkt aktiv.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Polypeptide in ihrem Abschnitt (1) eine Aminosäuresequenz eines Zytokins, eine funktionelle Variante einer Zytokin-Sequenz oder ein Fragment hiervon auf. Unter einer funktionellen Variante werden Sequenzen verstanden, die zumindest tw.,

5 vorzugsweise mindestens 50%, stärker bevorzugt mindestens 80 % der nativen Sequenz aufweisen und sich durch bspw. Deletion(en), Insertion(en) und/oder mindestens eine Mutation von der nativen Sequenz unterscheiden. In Hinblick auf ihr Wirkspektrum bzw. ihre Funktionalität sind die funktionellen Varianten i.S. dieser Erfindung weitgehend oder nahezu kongruent mit den nativen

10 Ausführungsformen. Hierbei ist eine Sequenzhomologie von mindestens 90, vorzugsweise mindestens 95 und am stärksten bevorzugt mindestens 97 % mit der entsprechenden nativen Sequenz bevorzugt. Bei einem funktionellen Fragment kann es sich um N-Terminal, C-terminal oder intrasequentiell verkürzte native Zytokin-Sequenzen handeln, insbesondere um gewisse Domänen,

15 vorzugsweise mindestens eine, stärker bevorzugt mindestens eine extrazelluläre Domäne der nativen Vollängen-Sequenz. Auch biologisch aktive Varianten dieser Fragmente werden erfindungsgemäß mitoffenbart.

Bevorzugt sind dabei solche Zytokine, deren funktionelle Varianten oder

20 Fragmente, die Mitglieder der TNF-Familie sind.

Weiterhin bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Polypeptide, die als Abschnitt (1) eine extrazelluläre Domäne (bzw. den extrazellulären Sequenzbereich) eines Zytokins, eine funktionelle Variante einer extrazellulären Domäne (bzw. des extrazellulären Sequenzbereichs) oder ein funktionelles Fragment einer extrazellulären Domäne (bzw. des extrazellulären Sequenzbereichs) aufweisen, insbesondere wenn es sich bei dem Zytokin um ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, ganz besonders um proapoptotische Mitglieder, handelt. Bei den abgeleiteten Varianten i.S. der Erfindung werden vorzugsweise

25 selektive Rezeptorbindungseigenschaften gegeben sein, wobei die Variante z.B. hinsichtlich ihrer spezifischen Bioaktivität oder anderer Eigenschaften (Stabilität) optimiert sein kann.

Ganz besonders bevorzugt ist als Abschnitt (1) eine extrazelluläre Domäne, eine funktionelle Variante einer extrazellulären Domäne oder ein funktionelles Fragment einer extrazellulären Domäne von TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand, AA 95-281, NCBI Accession No AAC50332 U37518) oder von FasL (AA 139-281, NCBI Accession No. AAC50124 U11821).

Das Wirkprinzip ist derartiger erfindungsgemäßer Konstrukte, wie beispielweise erfindungsgemäße Konstrukte mit dem Apoptoseinduktor TRAIL oder FasL als Abschnitt (1), ist insbesondere für all diejenigen Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie zutreffend, die für bestimmte Rezeptoren ausschließlich oder in besonders gutem Maße als Membranmolekül wirksam sind. Hierzu gehören neben TRAIL auch TNF (in Analogie zu TRAIL den TNF-R2 betreffend) und beispielsweise auch die Immunmodulatoren CD40L und CD30L. Besonders bevorzugt sind daher solche erfindungsgemäßen Polypeptide, die als spezifisches Zielmolekül einen zellmembranständigen Zytokinrezeptor erkennen. Hierzu gehören bspw. auch in einer nicht abschließenden Aufzählung die folgenden Liganden TNFSF1 (LTalpha), TNFSF2 (TNF), TNFSF3 (LTbeta), TNFSF4 (OX40L), TNFSF5 (CD40L), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27L), TNFSF8 (CD30L), TNFSF9 (4-1BBL), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13 (APRIL), TNFSF13B (BLYS), TNFSF14 (LIGHT), TNFSF15 (VEGI), TNFSF16 (CD30L), TNFSF18 (AITRL) und EDA, die oder deren Fragmente oder entsprechende funktionelle Varianten der nativen Sequenz oder der Fragmente gleichfalls als Abschnitt (1) in einem erfindungsgemäßen Konstrukt dienen können. Insbesondere werden diesbezüglich alle membranständigen Typ2 -Proteine (C-terminus extracellulär), deren Fragmente oder funktionellen Derivate, die eine trimere Organisation ihrer Untereinheiten als Voraussetzung für biologische Aktivität bedingen, mitoffenbart.

Der Linkerabschnitt (2) zwischen den Abschnitten (1) und (3) (Zytokin- bzw. Antikörper-Modul) stellt sich bei erfindungsgemäßen Polypeptidkonstrukten bspw. als eine flexible Verbindung dar, vorzugsweise jedoch ohne die intrinsischen

Trimerisierungseigenschaften des betreffenden Zytokins negativ zu beeinflussen, wie in den Beispieldkonstrukten (C), (D) und (F) (Linker-Aminosäuresequenz AAAVELE, s. Fig. 4) gezeigt. Vorzugsweise werden Linker mit intrinsischen Di- oder Multimerisierungseigenschaften (bspw. Tri- oder Hexamere) gewählt, bspw.

5 um eine erhöhte Stabilität des multimeren Konstruktes zu erreichen, z.B. durch intrinsische Struktureigenschaften des Linkerpeptids wie coiled-coil Strukturen und/oder Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken mit dem Ergebnis kovalenter Verknüpfungen. In diesem Fall stellt sich der Linker (Abschnitt (2)) als Polymerisierungsmodul dar.

10

Im Falle eines Linkers, der als Dimerisierungsmodul (Linkertyp 2a) wirkt, wird beispielsweise eine Immunoglobulin hinge Region und CH3-Domäne eines humanen Immunglobulins (AA 363-489, humanes IgG1, NCBI Accession No. AAF21613) bevorzugt (Linker im Beispieldkonstrukt (A), s. Fig. 4). Ein

15 Trimerisierungsmodul (Linkertyp 2b) als Linker kann bspw. aus einer Domäne des Tenascin-Moleküls (AA 110-139, Swiss Prot. Accession No. P10039, Huhn; oder Swiss Prot. Accession No. P24821, human) aufgebaut sein. Schließlich kann ein Linker als Hexamerisierungsmodul, also mit Hexamerisierungseigenschaften, beispielsweise eine im Vergleich zu Linkertyp 2b erweiterte Domäne des

20 Tenascinmoleküls (AA 34-139, Swiss Prot. Accession No. P10039, Huhn; oder Swiss Prot. Accession No. P24821, human) aufweisen (Linkertyp 2c). In jedem Fall können die Sequenzen von nativen Polypeptiden oder Fragmenten dieser nativen Polypeptide, die als Linker in Abschnitt (2) eines erfindungsgemäßem Polypeptids zum Einsatz kommen, auch in Form biologisch aktiver Varianten

25 derselben im Sinne dieser Erfindung und nach obiger Definition auftreten.

Alternativ sind in Abschnitt (2) andere, natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Linker-Peptide denkbar. Grundsätzlich kann ein Linker einer nativen oder variierten (Teil)sequenz aller Organismen, vorzugsweise aus Vertebraten, 30 insbesondere aus Säugetieren, vor allem aus dem Menschen, entsprechen. Ferner sind als Linker bspw. alle Sequenzabschnitte von Proteinen geeignet, die durch Ausbildung von Supersekundärstrukturen Di- oder Multimere generieren,

z.B. "Coiled-Coil-Helices" oder typische Kollagen-artige Tripelhelices (z.B. CMP, COMP, Kollagen, Laminin). Auch Abschnitte von Proteinen aus der C1q-Familie oder von Collectinen sind typischerweise für eine Di- oder Multimerisierung geeignet. So etwa kann bspw. die extrazelluläre Domäne eines Mitglieds der

5 TNF-Ligandenfamilie als Abschnitt (1) eines erfindungsgemäßen Polypeptids in Form eines Pentamers durch Rekombination mit den entsprechenden Pentamerisierungsdomänen von COMP als Linkerabschnitt (2) exprimiert werden. Erfindungsgemäß kann es sich um Homo- oder Heterodi- oder -multimere von erfindungsgemäßen Fusionsproteinen handeln.

10

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind weiterhin solche Polypeptide, deren Abschnitt (3) einen antigenbindenden Antikörper oder ein antigenbindendes Antikörperfragment aufweist. Hierbei wird ein erfindungsgemäßes Polypeptid dann ganz besonders bevorzugt sein, wenn der 15 Abschnitt (3) ein Antikörper oder ein Antikörperfragment eines Säugetiers, insbesondere murinen, oder humanen Ursprungs, ist oder ein humanisierter Antikörper oder ein humanisiertes Antikörperfragment, bspw. mit Säugetierursprung, ist. Im Falle der Humanisierung besteht der Abschnitt (3) typischerweise aus einem nach dem Stand der Technik hergestellten scFv 20 murinen, durch CDR grafting humanisierten oder vollständig humanen Ursprungs.

Der Abschnitt (3) eines erfindungsgemäßen Polypeptids wird vorzugsweise Spezifität für ein im Tumorgewebe selektiv bzw. dominant exprimierte Antigen aufweisen. Dieses Tumorantigen kann prinzipiell auf den malignen Zellen selbst 25 exprimiert sein oder auch im nichtmalignen Anteil des Tumors, den Stromazellen oder dem Tumorendothel. Derartige Antigene nichtmaligner Gewebeanteile eines soliden Tumors (Karzinoms) sind einerseits genetisch invariant, andererseits bei unterschiedlichsten Tumorentitäten vorkommend und damit universelle Tumormarker. Beispiele für derartige Tumorantigene, gegen die ein 30 Antikörper oder Antikörperfragment des Abschnitts (3) eines erfindungsgemäßen Polypeptids gerichtet sein kann, sind der VEGFR bzw. der VEGFR/VEGF Komplex sowie das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und die Fibronectin Isoform βFn als weitgehend

selektive Zielstrukturen des Tumorendothels und das Fibroblast activation protein (FAP) als selektiver Marker des Tumorstromas. Alle vorgenannten Beispiele können mit spezifischen scFv wirksam erfasst werden, weswegen sich derartige scFv („single chain Fv“) besonders als Abschnitt (3) auf einem erfindungsgemäßen Antikörper eignen.

5 Als bevorzugt für den Abschnitt (3) eines erfindungsgemäßen Polypeptids erweisen sich damit Antikörperfragmente in verschiedenen Antikörperformaten, z.B. scFv, Fab oder komplettes Immunglobulin.

10

Damit stellt sich ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Polypeptid (Beispiele siehe Abb. 2 und 3) als ein rekombinantes, homo-di- oder -trimeres Fusionsprotein prinzipiell enthaltend in einer definierten Abfolge der folgenden Strukturelemente (Monomer): (Abschnitt (3)) N-terminal einem murinen, humanisierten oder humanen Einzelkettenantikörperfragment (scFv) bestehend aus VH-peptid-linker-VL; Abschnitt (2) einer Linkersequenz ohne oder mit kovalenten Multimerisierungseigenschaften, z.B. Dimerisierungs- (2a), Trimerisierungs- (2b) oder Hexamerisierungs-Domäne (2c); (Abschnitt (1)) der humanen extrazellulären Domäne des TRAIL (AA 95-281, NCBI Accession No. U37518) oder des FasL (AA 139-281, NCBI Accession No U11821) C-terminal. Analog können bspw. CD40L oder andere Zytokinmitglieder der TNF-Familie als Abschnitt (1) entsprechender erfindungsgemäßer Polypeptide dienen.

25 Offenbart werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch alle sich aus den erfindungsgemäßen Konstrukten durch spezifische Linkerwahl (2) ergebenden Di- oder Multimere, auf die sich die Gesamt offenbarung zu erfindungsgemäßen Konstrukten inhaltsgleich bezieht. Insoweit fällt ein Di- oder Multimer von erfindungsgemäßen Polypeptiden nach Maßgabe der vorliegenden Offenbarung immer unter den weiteren Begriff „erfindungsgemäßes Polypeptid“.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind DNA-Sequenzen, die für Fusionsproteine der vorgenannten erfindungsgemäßen Art kodieren

(Nukleinsäurekonstrukte) oder einen solchen für ein erfindungsgemäßes Polypeptid codierenden Bereich enthalten. Derartige DNA-Sequenzen werden in Expressionsvektoren exprimiert, wobei auch die entsprechenden Expressionsvektoren, die eine DNA-Sequenz für die erfindungsgemäßes

5 Fusionsproteine enthalten, Gegenstand der Erfindung sind. Vorzugsweise weisen erfindungsgemäß Vektoren die Fähigkeit zur Expression und/oder Amplifikation in einer prokaryontischen und/oder eukaryontischen Zelle auf, insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Plasmidvektoren, bspw. pBABEpuro, oder auch retrovirale Vektoren, insbesondere auch alle jene Vektorsysteme, die 10 gentherapeutisch zur Anwendung kommen können, z.B. auch adenovirale Vektorsysteme. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden damit auch gentherapeutische Verfahren mit erfindungsgemäß Vektoren oder Nukleinsäurekonstrukten als Behandlungsmethode für die erfindungsgemäß offenbarten medizinischen Indikationen offenbart.

15 Weiterhin gehören zur vorliegenden Erfindung solche Wirtszellen, die mit DNA-Sequenzen (Nukleinsäurekonstrukte), die für die erfindungsgemäß Fusionsproteine kodieren, transfiziert sind. Ganz besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Wirtszellen, die mit erfindungsgemäß Expressionsvektoren oder erfindungsgemäß Nukleinsäurekonstrukten transfiziert sind, wobei die Expressionsvektoren wiederum DNA-Sequenzen enthalten, die für die erfindungsgemäß Fusionsproteine kodieren.

20 Nukleinsäurekonstrukt, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Nukleotidsequenz, codierend für ein Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, enthält.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung (Expression und Isolierung) von erfindungsgemäß Polypeptiden, wobei ein erfindungsgemäß Isolierungsverfahren typischerweise gekennzeichnet ist durch (a) Bereitstellen eines erfindungsgemäß Vektors oder

30 eines Nukleinsäurekonstrukt, (b) Transfektion von Zellen mit einem gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Vektor oder Nukleinsäurekonstrukt, (c) Kultivierung der gemäß (b) transfizierten Zellen, und (d) Isolierung von unter

entsprechenden Bedingungen exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptiden aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt hierbei typischerweise nach dem Stand der Technik in geeigneten Expressionssystemen, vorzugsweise als sezerniertes Produkt stabiler

5 Transfektanten, z.B. CHO-Zellen oder in anderen tierischen Zellen wie Cos7 oder SF9 (Insektenzellen) bzw. weiteren eukaryontischen Zellsystemen, z.B. *Pichia pastoris*. Vorzugsweise werden die exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptide jeweilige zur Sekretion in dem Zellsystem geeignete Leadersequenzen aufweisen. Daher werden die zur Expression eingesetzten erfindungsgemäßen Vektoren

10 auch codierende Abschnitte enthalten, die für eine funktionelle Leadersequenz codieren, z.B. wie in Brocks et al. (Immunotechnology 3:173-184, 1997) für Säuger und Insektenzellen beschrieben, bzw. pPICZalpha-Vektoren (INVITROGEN) zur Expression und Sekretion in der Hefe *Pichia pastoris*.

15 Erfindungsgemäße Polypeptide, ggf. aber auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren oder Wirtszellen, (hier unter der Kategorie „erfindungsgemäße Substanzen“ zusammengefaßt), kommen auch als Arzneimittel oder zur Herstellung eines Arzneimittels in Betracht. Ihre Verwendung ist insbesondere dann gegeben, wenn erfindungsgemäße Substanzen nach antikörpervermittelter Bindung des

20 Fusionsproteins an ein spezifisches, zellmembranexprimierte Zielmolekül die volle biologische Wirkung über den entsprechenden Zytokin-Rezeptor entfalten soll. Durch geeignete Auswahl der Antikörperspezifität wird die Zytokin-Aktivität der erfindungsgemäßen Substanz auf das zu behandelnde Gewebe, z.B. Tumorgewebe, gerichtet und es kann ein auf die jeweilige Indikation/Tumorentität

25 spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden. Ein erfindungsgemäßes Polypeptid wird z.B. bei Anwendung als Tumortherapeutikum, insbesondere zur Behandlung solider Tumore, aber auch lymphatischer Tumore (benigne oder maligne), nach in vivo Verabreichung durch den Antikörper-Anteil zunächst spezifisch im Tumoralreal durch vom Tumor selbst

30 oder das reaktive Tumorstroma/Tumorgefäßsystem gebildete Membranmarker angereichert und dort Zytokin-Rezeptor-positiven Tumorzellen oder

zytokinsensitiven Zellen des reaktiven tumorversorgenden Normalgewebes präsentiert.

Die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen ist aber grundsätzlich auch 5 immer dann zur Anwendung im therapeutischen Bereich erwünscht, wenn die Aktivierung einer Signaltransduktionskette, bspw. die durch die TNF-Rezeptorfamilie ausgelösten Signalkaskaden, bspw. eine apoptotische Signalkaskade ausgelöst werden soll. Somit kommt die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen bei der Behandlung bzw. zur Herstellung eines 10 Arzneimittels zur Behandlung aller hyperproliferativer Erkrankungen in Betracht, bspw. auch zur zielgerichteten Ausschaltung von Zellen des Immunsystems bei überschießenden Immunreaktionen, bspw. bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus und TEN, oder bei fehlgeleiteten Immunreaktionen gegen Fremdantigene, wie sie z.B. bei 15 Infektionserkrankungen (bakteriell (bspw. durch Mykobakterien), viral oder protozoologisch) auftreten können. In Betracht kommt ferner die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen oder allgemeinen hyperinflammatorischen Zuständen, insbesondere chronischen Entzündungen, bspw. auch bei Allergien, aber auch die Behandlung von Abstoßungsreaktionen des Immunsystems des Patienten 20 gegen Fremdgewebe. In den vorgenannten Fällen muß jeweils der Antigen-bindende Abschnitt (3) eines erfindungsgemäßen Polypeptids charakteristische Marker auf der Oberfläche der Zielzellen, bei denen vorzugsweise eine apoptotische Signalkaskade mit dem Ziel des Zelltods ausgelöst werden soll, erkennen. Im Falle der Behandlung nach Transplantation von Fremdgewebe 25 werden also bspw. die körpereigenen für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Zellen des Immunsystems des Transplantationspatienten als Zielzellen dienen.

Erfindungsgemäße Gegenstände, wie Nukleinsäurekonstrukte, Expressionsvektoren oder Wirtszellen kommen – wie zuvor offenbart – gleichfalls 30 als Arzneimittel bspw. zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen in Betracht. In diesem Fall werden vorzugsweise dem zu behandelnden Patienten zu transfizierende Zellen entnommen, diese in vitro mit erfindungsgemäßen

Expressionsvektoren transfiziert, kultiviert und dann als Retransplantat in den Patienten überführt. Die Transfektion wird vorzugsweise durch Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionsvektoren vorgenommen, die die Expression an einen regulierbaren Promotor koppeln. Das transfizierte 5 Eigentransplantat kann lokal bspw. injiziert werden – abhängig von der spezifischen Erkrankung und den spezifischen Zielzellen. Lokale Verabreichung ist bspw. im Fall einer Tumortherapie bevorzugt. Hierbei werden Tumorzellen dem Patienten entnommen, in vitro transfiziert und dann, sofern möglich, direkt in den Tumor injiziert, bspw. zur Behandlung von Hauttumoren (z.B. Melanomen), 10 Tumoren des Nervensystems (z.B. Glioblastomen).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zusammensetzung, enthaltend erfindungsgemäße Polypeptide, erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte, erfindungsgemäße Vektoren und/oder 15 erfindungsgemäße Wirtszellen sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder Trägersubstanzen (z.B. auch Lösungsvermittler). Damit wird erfindungsgemäß eine Kombination erfindungsgemäßer Substanzen mit pharmazeutisch akzeptablen Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen offenbart. Entsprechende Herstellungswege sind bei "Remington's Pharmaceutical 20 Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) offenbart, das Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung ist. Für die parenterale Verabreichung kommen als Trägerstoffe bspw. steriles Wasser, sterile Kochsalzlösungen, Polyalkylenglykole, hydrogenierte Naphthalen und insbesondere biokompatible Lactidpolymere, Lactid/Glycolidcopolymer oder Polyoxyethylen-/Polyoxypropylencopolymere in Betracht. Derartige erfindungsgemäße Zusammensetzungen kommen für alle oben offenbarten medizinischen 25 Indikationen in Betracht. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Zusammensetzungen Füllsubstanzen oder Substanzen, wie Lactose, Mannitol, Substanzen zur kovalenten Anknüpfung von Polymeren, wie z.B. 30 Polyethylenglykol an erfindungsgemäße Inhibitoren, Komplexierung mit Metallionen oder Einschluß von Materialien in oder auf besondere Präparationen von Polymerverbindung, wie z.B. Polylaktat, Polyglykolsäure, Hydrogel oder auf

Liposomen, Mikroemulsion, Micellen, unilamellare oder multilamellare Vesikel, Erythrozyten-Fragmente oder Sphäroplasten, enthalten. Die jeweiligen Ausführungsformen der Zusammensetzungen werden abhängig vom physikalischen Verhalten, beispielsweise in Hinblick auf die Löslichkeit, die 5 Stabilität, Bioverfügbarkeit oder Abbaubarkeit gewählt. Kontrollierte oder konstante Freisetzung der erfindungsgemäßen Wirkstoffkomponente in der Zusammensetzung schließt Formulierungen auf der Basis lipophiler Depots ein (z.B. Fettsäuren, Wachse oder Öle). Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Beschichtungen erfindungsgemäßer Substanzen oder 10 Zusammensetzungen, enthaltend solche Substanzen, nämlich Beschichtungen mit Polymeren offenbart (z.B. Poloxamere oder Poloxamine). Weiterhin können erfindungsgemäße Substanzen bzw. Zusammensetzungen protektive Beschichtungen, z.B. Proteaseinhibitoren oder Permeabilitätsverstärker, aufweisen.

15

Grundsätzlich werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung für erfindungsgemäße Substanzen oder erfindungsgemäße Zusammensetzungen alle im Stand der Technik bekannten Verabreichungswege offenbart, bevorzugt 20 erfolgt die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen oder Störungen auf dem parenteralen, d.h. beispielsweise subkutanen, intramuskulären oder intravenösen, oder oralen oder intranasalen Verabreichungsweg. Typischerweise werden erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen fest, flüssig oder aerosolartig (z. B. Spray) sein – je nach 25 Art der Konfektionierung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass erfindungsgemäß Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine mit proapoptotischen und immunmodulierenden Eigenschaften 30 zur Verfügung gestellt werden, die lösliche Formen a priori membranständiger Zytokine enthalten. Durch die im erfindungsgemäßen Polypeptid vorhandene Antikörper-Funktion kann das im übrigen bioinaktive, respektive eingeschränkt

aktive Zytokin durch Bindung an ein spezifisches, zellmembranständiges Zielmolekül die volle biologische Zytokin-Wirkung über den/die entsprechenden Zytokinrezeptor/en entfalten. Durch geeignete Auswahl der Antikörperspezifität wird die Zytokin-Aktivität auf das zu behandelnde Gewebe, z.B. Tumorgewebe, 5 gerichtet und es kann ein auf die jeweilige Indikation/Tumorentität spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden. Insgesamt wird somit die Selektivität der Zytokin-Wirkung mit den vorliegenden erfindungsgemäßen Polypeptiden durch zwei Mechanismen erreicht: Einerseits über die Antikörper-vermittelte, bspw. scFv, selektive Anreicherung des im nicht 10 antigengebundenen Zustand inaktiven, respektive eingeschränkt aktiven Zytokins im Tumor und andererseits durch dessen ortsspezifische Aktivierung via Präsentation in ein voll signalfähiges, vor allem auch Apoptose-induzierendes Moleköl.

15

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert.

Figur 1 zeigt das Ergebnis einer gelelektrophoretischen Auftrennung nach der Expression eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins (Struktur des 20 Fusionsproteins s. Ausführungsbeispiel 1, TRAIL-AMAIZe(MBOS4), abgekürzt in Fig.1 als MBOS4-TRAIL). Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass das Fusionsprotein unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Bande bei ca. 140 kDa ergibt, was mit dem kalkulierten MW des CH3-verknüpften Dimers von $2 \times 65 = 130$ kDa gut übereinstimmt.

25

In Figur 2 sind die Ergebnisse von Untersuchungen in Hinblick auf die präferentielle Apoptoseinduktion durch Beispiele einiger erfindungsgemäßer AMAIZe-Polypeptide auf FAP-positiven Tumorzellen dargestellt. Figur 2 zeigt in allen ihren Bestandteilen (Figuren 2A bis 2F) eine Auftragung der Zellaktivität (in 30 %) gegen die Konzentration der jeweils angegebenen AMAIZe-Proteine. Die in Figur 2A eingezeichneten Kurvenverläufe (Legende in Figur 2) geben die Ergebnisse der Behandlung von FAP-positiven (HT1080-FAP) oder FAP-

negativen (HT 1080) Zellen mit TRAIL-AMAIze(MBOS4) nach Vorinkubation mit dem FAP-spezifischen Antikörper cF19 bzw. ohne entsprechende Vorinkubation wieder.

In allen weiteren dargestellten Fällen (Fig.2B-F) ist zu erkennen, daß die

5 Zytotoxizität der verschiedenen AMAIze-Konstrukte immer auf den Antigen-exprimierenden Zellen (HT1080-FAP), d.h. den Zellen, auf denen die erfindungsgemäßen AMAIze-Konstrukte Antikörper-vermittelt binden, größer ist als auf den entsprechenden Antigen-negativen parentalen Zellen (HT1080).

Die Abhängigkeit der gesteigerten Sensitivität FAP-exprimierender Zellen von der
10 Bindung von erfindungsgemäßen AMAIze-Konstrukten an FAP ist beispielhaft in Fig. 2A gezeigt: Hier wird durch Kompetition eines FAP-spezifische Antikörpers cF19 (cF19, schwarze Quadrate) mit dem AMAIze Konstrukt TRAIL-AMAIze(MBOS4) um die Bindung an das zellexprimierte FAP die zytotoxische Wirkung eben dieses AMAIze-Konstrukt auf den FAP-positiven Zellen auf ein
15 Maß reduziert, wie es auch in FAP-negativen Zellen beobachtet wird. Auf FAP-negative Zellen hat die Zugabe von cF19 hingegen keinen Einfluß. Damit ist die Antikörper-vermittelte Spezifität durch kompetitive Hemmung der verstärkten Apoptose-Induktion über den FAP spezifischen monoklonalen Antikörper cF19 eindeutig belegt.

In Figur 3 sind Beispiele von erfindungsgemäßen AMAIze-Konstrukten mit TRAIL und mit FasL als Zytokin-Modul, den unabhängigen FAP-spezifischen Antikörpern Klon OS4 und Klon 40 sowie verschiedenen Linkern zwischen Antikörper- und Zytokin-Modul dargestellt (erfindungsgemäße Konstrukte (A)-(F)). Alle erfindungsgemäßen Konstrukte besitzen die Eigenschaft der antigenabhängigen Induktion/Verstärkung von Apoptose. Die hergestellten Konstrukte sind im folgenden schematisch dargestellt. Ihre spezifische AMAIze-Aktivität (präferentielle Apoptoseinduktion auf antigen-positiven Zellen) findet sich in Figur 2 beschrieben. Der für die AS-Sequenzen vorliegendenfalls gewählte Code ist der Ein-Buchstaben-Code). Abschnitt (2) (der Linker) stellt die Verbindung zwischen dem Abschnitt (3) (bspw. scFv) und dem Zytokin-Anteil (1) (bspw. TRAIL oder FasL in den dargestellten Konstrukten) im erfindungsgemäßen Molekül her und gewährleistet, im Falle des Einsatzes von speziellen Linkern bspw. des Typs 2a, 2b oder 2c, gleichzeitig die kovalente Verknüpfung des Fusionsproteins während der Biogenese.

20 Konstrukt (A): TRAIL-AMAIze(MBOS4)

NH₂-[Leader]-[OS4-VH/VL]-[Linker1]-[CH3]-[Linker2]-[TRAIL(95-281)]-COOH

OS4-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment

CH3: CH3-Domäne (AA 363-489) eines humanen IgG1

25 Linker1: "hinge"-Region eines humanen IgG1 (**Fettdruck**) mit einem C-terminalen poly Gly-Linker (kursiv)
(RTVAAPSVFAVFAAAVEPKSCDKTHTCPPC~~GGGSSGGG~~
SG)

Linker2: poly Gly-Linker (GGGGTGGGS)

30 TRAIL(95-281): extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL (AA 95-281)

Der Linker des Konstrukts (A): TRAIL-AMAIze(MBOS4) besitzt Dimerisierungseigenschaften.

5 **Konstrukt (B): TRAIL-AMAIze(OS4)**

NH₂-[Leader]-[OS4-VH/VL]-[Linker]-[TRAIL(95-281)]-COOH

OS4-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment

Linker: RTVAAPSVFAVFAAAVELE

10 TRAIL(95-281): extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL (AA 95-281)

Konstrukt (C): TRAIL-AMAIze(40)

NH₂-[Leader]-[40-VH/VL]-[Linker]-[TRAIL(95-281)]-COOH

15 40-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment

Linker: AAAVELE

TRAIL(95-281): extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL (AA 95-281)

20 **Konstrukt (D): FasL-AMAIze(40)**

NH₂-[Leader]-[40-VH/VL]-[Linker]-[FasL(139-281)]-COOH

40-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment

25 Linker: AAAVELE

FasL(139-281): extrazelluläre Domäne des humanen FasL (AA 139-281)

Konstrukt (E): FasL-AMAIze(OS4)

NH₂-[Leader]-[OS4-VH/VL]-[Linker]-[FasL(139-281)]-COOH

30 OS4-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment

Linker: RTVAAPSVFAVFAAA

FasL(139-281): extrazelluläre Domäne des humanen FasL (AA 139-281)

Konstrukt (F): FasL-AMA1Ze(40-Flag)

NH₂-[Leader]-[40-VH/VL]-[Flag-tag]-[Linker]-[FasL(139-281)]-COOH

5 40-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment
Flag-tag: DYKDDDDK
Linker: AAAVELE
FasL(139-281): extrazelluläre Domäne des humanen FasL (AA 139-281)

10

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

15 **Beispiel 1**

Expression eines erfindungsgemäßes Fusionsproteins

Es wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein in CHO-DG44-Zellen exprimiert.

Bei diesem Fusionsprotein handelt es sich um TRAIL-AMA1Ze(MBOS4), abk.

20 MBOS4-TRAIL in Fig.1, (kovalentes Dimer) mit nachfolgender Struktur (s. auch Figur 3):

NH₂-[Leader]-[OS4-VH/VL]-[Linker1]-[CH3]-[Linker2]-[TRAIL(95-281)]-COOH

OS4-VH/VL: FAP-spezifisches humanes "single chain"-Antikörperfragment
25 CH3: CH3-Domäne (AA 363-489) eines humanen IgG1
Linker1: "hinge"-Region eines humanen IgG1 (**Fettdruck**) mit einem C-terminalen poly Gly-Linker (**kursiv**)
 (RTVAAPSVFAVFAAAVEPKSCDKTHCPPCGGGSSGGSG)
Linker2: poly Gly-Linker (GGGGTGGGS)
30 TRAIL(95-281): extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL (AA 95-281)

Beispiel 2**Konstruktion der erfindungsgemäßen Polypeptide FasL-AMAIZe(40) und TRAIL-AMAIZe(40)**

5

Die Fusionsproteine wurden, wie folgt, hergestellt:

1. Das single chain Antikörper Fragment (scFv) Nr. 40 (im weiteren als 40 bezeichnet) wurde nach Standardmethoden aufgrund der Bindung an FAP aus einer scFv-Phagen Expressionsbank, die in dem Vektor pSEX (siehe Brocks et al, Molecular Medicine 7:461-469; Mersmann et al, Int.J. Cancer 92:240-248) vorlag, isoliert.
2. Der scFv 40 wurde mittels Pvu2 und Not1 aus pSEX ausgeschnitten und in die entsprechenden sites des Minibody-Konstrukts pW6 (Wüest, T., Dissertation Uni Stuttgart, 2001) eingesetzt. Hierzu wurde dem Plasmid pW6 zuvor der zwischen diesen Stellen liegende DNA-Bereich durch entsprechenden Restriktionsverdau und präparativer Agarosegel-Elektrophorese nebst DNA-Elution entfernt. Durch diesen Klonierungsschritt wurde der scFv 40 so zwischen eine eukaryotische Ig Leadersequenz (upstream von 40) und der konstanten Region (Fc Region) eines humanen Antikörpers (IgG1, downstream von 40) kloniert, daß die Expression eines sekretierbaren, divalenten Minibodies, wie bei Hu et al (Cancer Research 56:3055) beschrieben, möglich ist.
3. Leader + scFv 40 + Fc wurden durch proof-reading PCR mit den Primern 1 und 2 amplifiziert und das scFv Fragment mittels der durch den Primer 1 eingeführten Kpn1-Schnittstelle und der zwischen scFv 40 und Fc-Region liegenden Not1-Schnittstelle in die entsprechenden Schnittstellen des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1 (Invitrogen) eingeführt .

4a. Zur Fertigstellung von FasL-AMAIze(40) wurden die AS 139 bis 281 + Stopcodon von humanem FasL mittels der Primer 3 und 4 und proof-reading PCR amplifiziert und in die Schnittstellen Not1 und Xba1 des in 3. erhaltenen pcDNA3.1-Klonierungsintermediates eingesetzt. In das FasL-Amplikon wurden hierzu durch die verwendeten Primer eine Not1 und eine Nhe1-Schnittstelle, die mit Xba1 kompatibel ist, eingefügt. Das so erhaltene fertige Konstrukt erlaubt die Expression des Fusionsproteins FasL-AMAIze(40).

5
4b. Zur Fertigstellung von TRAIL-AMAIze(40) wurden die AS 95 bis 281 + Stopcodon von humanem TRAIL mittels den Primern 5 und 6 und proof-reading PCR amplifiziert und in die Schnittstellen Not1 und Xba1 des in 3. erhaltenen pcDNA3.1-Klonierungsintermediates eingesetzt. In das TRAIL-Amplikon wurden hierzu durch die verwendeten Primer eine Not1 und eine Xba1-Schnittstelle eingefügt. Das so erhaltene fertige Konstrukt erlaubt die 10 Expression des Fusionsprotein TRAIL-AMAIze(40).

15
5. Zur Gewinnung von TRAIL-AMAIze(40) bzw. FasL-AMAIze(40) wurden HEK293 Zellen mit den unter 4. beschriebenen Konstrukten nach Angaben des Herstellers mit Lipofektamin (Gibco-BRL) transfiziert. 48 Stunden nach 20 Transfektion wurden die AMAIze-Konstrukt-Überstände sterilfiltriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Alle Klonierungs- und PCR-Amplifikationsschritte erfolgten nach üblichen Standardprozeduren mit den nachfolgenden Primern. Alle Konstrukte wurden zur 25 Verifikation der cDNA-Sequenz sequenziert.

Primer 1

5'CGG GGT ACC TCG ACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG 3'

Primer 2

5'CCG GAA TTC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTT GAG CC 3'

30 Primer 3

5'CTA GGT GCG GCC GCA GTT GAG CTC GAG GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG 3'

Primer 4

5'CTA GCT AGC GTG CTT CTC TTA GAG CTT ATA TAA GCC 3'

Primer 5

5'GTC TTC GCG GCC GCA GTT GAG CTC GAG ACC TCT GAG GAA ACC ATT

5 TCT ACA G 3'

Primer 6

5'TGC TCT AGA CCA GGT CAG TTA GCC AAC TAA AAA GGC 3'

10 Beispiel 3

Nachweis der Antigen-abhängigen Aktivierung am Beispiel des FAP-spezifischen TRAIL-AMAIZe(MBOS4) (siehe auch Fig. 2A).

15 TRAIL-AMAIZe(MBOS4) wurde – wie analog wie in Beispiel 2 beschrieben – bereitgestellt.

Anschließend wurden FAP-positive (HT1080-FAP) und FAP-negative (HT1080) Zellen mit dem FAP-spezifischen Antikörper cF19 vorinkubiert (1h) oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden über Nacht in Gegenwart von CHX (2.5 µg/ml)

20 mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL-AMAIZe(MBOS4) inkubiert. Die Quantifizierung der überlebenden Zellen erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. In Figur 2A ist die Wirkung des TRAIL-AMAIZe(MBOS4) auf Zielzellen, die spezifisch vom Antikörper-Anteil des Fusionsproteins erkannt werden (FAP positive HT 1080) dargestellt.

25

Beispiel 4

Präferentielle Apoptoseinduktion durch TRAIL-AMAIZe und FasL-AMAIZe auf FAP-positiven Tumorzellen (siehe auch Fig. 2A-F).

30 15 x 10³ HT1080 oder HT1080-FAP Zellen pro well einer 96-well Platte wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Mengen der verschiedenen Konstrukte für weitere 14-18 Stunden in der Anwesenheit von 2.5 µg/ml CHX (zur Sensibilisierung der Zellen für die Induktion

von Todesrezeptor-vermittelter Apoptose) behandelt. Dann wurde abschließend die Vitalität der Zellen durch Färbung mit Kristall-Violett bestimmt. Die jeweiligen Werte für unbehandelte Gruppen lag in allen Fällen zwischen 700 und 850 mOD. Kontrollgruppen, in denen alle Zellen dem Zelltod anheimfielen, wiesen Werte von 5 100 bis 150 mOD auf. Zelltod der entsprechenden Positiv-Kontrollgruppen wurde durch sekundäres Quervernetzen eines löslichen, Flag-markierten FasL-Konstruktes (500 ng/ml) mittels des Flag-spezifischen Antikörpers M2 (Sigma) erreicht. Auch in diesem Fall wurden den Kulturen 2.5 µg CHX zugegeben.

Ansprüche

1. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass es (i) einen Abschnitt (1) mit einer biologischen Aktivität für ein spezifisches Zielmolekül, (ii) einen N-terminal von Abschnitt (1) einen Abschnitt (2), welcher ein Peptidlinker ist, und (iii) einen Abschnitt (3), welcher ein Antikörper oder davon abgeleitetes Fragment ist und ein spezifisches Zielmolekül auf einer Zelloberfläche selektiv erkennt, enthält, wobei das Polypeptid ohne ortsspezifische und/oder selektive Bindung des Abschnitts (3) an das Zielmolekül biologisch inaktiv bzw. eingeschränkt aktiv ist.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Abschnitt (1) eine Aminosäuresequenz eines Zytokins oder ein Fragment hiervon enthält.
3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytokin eine extrazelluläre Domäne, eine funktionelle Variante einer extrazellulären Domäne oder ein funktionelles Fragment einer extrazellulären Domäne eines Mitglieds der TNF-Familie ist.
4. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytokin eine extrazelluläre Domäne, eine funktionelle Variante einer extrazellulären Domäne oder ein funktionelles Fragment einer extrazellulären Domäne von TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand, AA 95-281, NCBI Accession No AAC50332) oder von FasL (AA 139-281, NCBI Accession No. AAC50124) ist.
5. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es als spezifisches Zielmolekül einen zellmembranständigen Zytokinrezeptor erkennt.

6. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abschnitt (2) die Abschnitte (3) und (1) verbindet und ein intrinsisches, definiertes Polymerisierungsmodul ist.

5 7. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymerisierungsmodul aus einem natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Peptid besteht, welches Dimerisierungseigenschaften, z. B. einer Immunglobulin hinge Region und CH3-Domäne eines humanen Immunglobulins (AA 363-489, humanes 10 IgG1, NCBI Accession No. AAF21613), und/oder intrinsische Trimerisierungseigenschaften, z. B einer Domäne des Tenascin-Moleküls, und/oder Hexamerisierungseigenschaften, z. B. einer erweiterten Domäne des Tenascinmoleküls (AA34-139, Swiss Prot. Accession No. P10039, Huhn, Swiss. Prot. Accession No. P24821, human), besitzt.

15 8. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abschnitt (3) ein antigenbindender Antikörper oder ein antigenbindendes Antikörperfragment ist.

20 9. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abschnitt (3) ein Antikörper oder ein Antikörperfragment eines Säugetiers, insbesondere murinen, oder humanen Ursprungs, ist oder ein humanisierter Antikörper oder ein humanisiertes Antikörperfragment ist.

25 10. Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Antikörperfragment in verschiedenen Antikörperformaten vorliegen kann z.B. als scFv, Fab oder komplettes Immunglobulin.

11. Nukleinsäurekonstrukt, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Nukleotidsequenz, codierend für ein Polypeptid nach einem der vorgenannten Ansprüche, enthält.

5 12. Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 enthält.

13. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 12 enthält.

10 14. Verfahren zur Isolierung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass

(a) ein Vektor gemäß Anspruch 12 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 hergestellt wird,

15 (b) Zellen mit einem gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Vektor oder Nukleinsäurekonstrukt transfiziert werden,

(c) die gemäß (b) transfizierten Zellen kultiviert werden, und

(d) unter entsprechenden Bedingungen exprimierte Polypeptide aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert werden.

20 15. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-10, eines Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11, eines Vektors nach Anspruch 12 oder einer Wirtszelle nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Arzneimittels.

25 16. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-10, eines Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11, eines Vektors nach Anspruch 12 oder einer Wirtszelle nach Anspruch 13 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Erkrankungen.

17. Zusammensetzung, enthaltend Polypeptide einem der Ansprüche 1-10, Nukleinsäurekonstrukte nach Anspruch 11, Vektoren nach Anspruch 12 und/oder Wirtszellen nach Anspruch 13 sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder Trägersubstanzen.

5

18. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 17 zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselkrankungen, Entzündungszuständen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Erkrankungen.

10

15

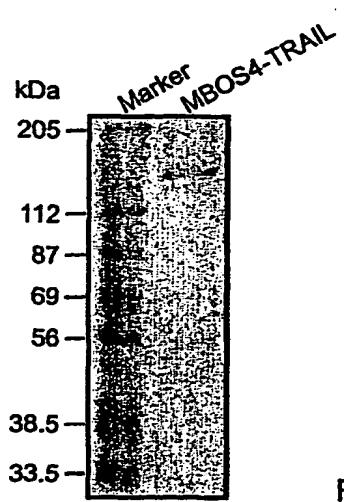


Fig. 1

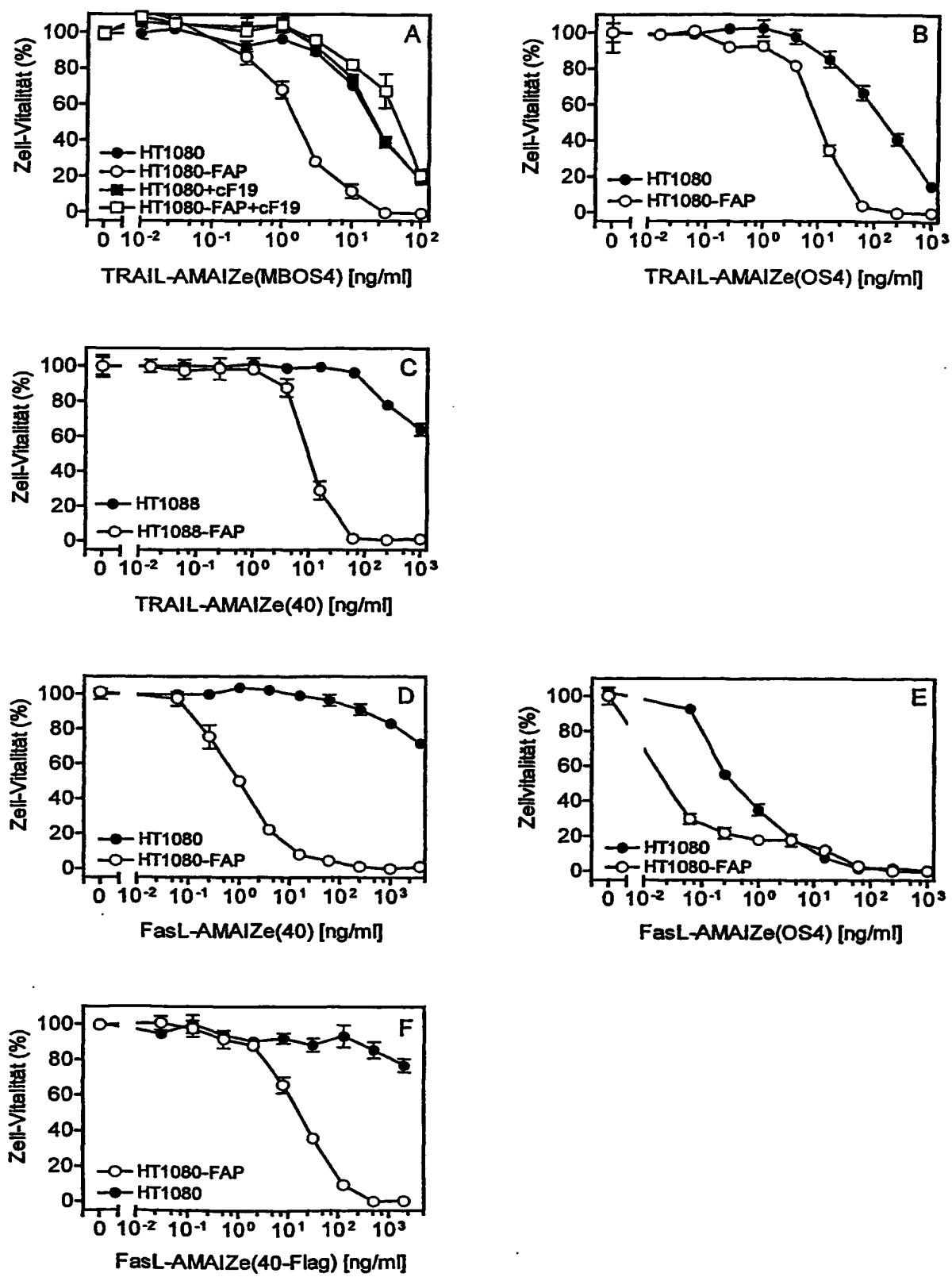


Fig. 2

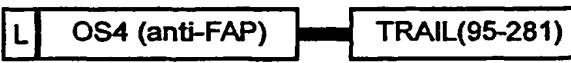
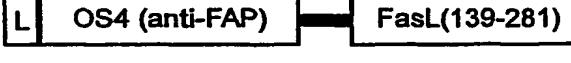
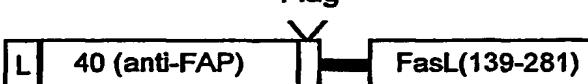
Kennbuchstaben	Konstrukt schema	Name
A		TRAIL-AMAIZe(MBOS4)
B		TRAIL-AMAIZe(OS4)
C		TRAIL-AMAIZe(40)
D		FasL-AMAIZe(40)
E		FasL-AMAIZe(OS4)
F		FasL-AMAIZe(40-Flag)

Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

ANMELDER

5 NAME: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
STRASSE: Seehausstraße 7
ORT: Tiefenbronn
POSTLEITZAHL: 75233
TELEFON: 07 11/6 85 69 86
10 TELEFAX: 07 11/6 85 74 84

AKTENZEICHEN:

15 BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Ortsspezifische, antikörpervermittelte Aktivierung proapoptotischer Zytokine:

AMAIZE (Antibody-Mediated Apoptosis Inducing Zytokine)

20

ANZAHL DER SEQUENZEN: 6 DNA Sequenzen
6 Proteinsequenzen

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

25 DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: PC
BETRIEBSSYSTEM: MS DOS
SOFTWARE: Windows NT

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMAIZE

AZ#

Anmeldernummer:

5

Sequenzbeschreibung 1: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1845) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-614) eines 10 erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMAIZE am Beispiel von TRAIL-AMAIZE (MBOS4) (Konstrukt A).

15	1	M D W T W R V F C L L A V A P G	16
	1	ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT GGG	48
	17	A H S Q V Q L V Q S G A E V K K	32
	49	GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA	96
20	33	P G A S V K V S C K T S R Y T F	48
	97	CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA ACT AGT AGA TAC ACC TTC	144
	49	T E Y T I H W V R Q A P G Q R L	64
25	145	ACT GAA TAC ACC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG	192
	65	E W I G G I N P N N G I P N Y N	80
	193	GAG TGG ATA GGA GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT ATT CCT AAC TAC AAC	240
30	81	Q K F K G R V T I T V D T S A S	96
	241	CAG AAG TTC AAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GTA GAC ACC TCT GCC AGC	288
	97	T A Y M E L S S L R S E D T A V	112
	289	ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC	336
35	113	Y Y C A R R R I A Y G Y D E G H	128
	337	TAC TAC TGC GCC AGA AGA ATC GCC TAT GGT TAC GAC GAG GGC CAT	384
	129	A M D Y W G Q G T L V T V S S A	144
	385	GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA GCC	432
40	145	S T K G P K L E E G E F S E A R	160
	433	TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC	480
	161	V D I V M T Q S P D S L A V S L	176
45	481	GTA GAC ATT GTG ATG ACC CAA TCT CCA GAC TCT TTG GCT GTG TCT CTA	528
	177	G E R A T I N C K S S Q S L L Y	192
	529	GGG GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT	576
50	193	S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G	208
	577	TCT AGA AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA	624
	209	Q P P K L L I F W A S T R E S G	224
	625	CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TTT TGG GCT AGC ACT AGG GAA TCT GGG	672
55	225	V P D R F S G S G F G T D F T L	240
	673	GTA CCT GAT AGG TTC AGT GGC AGT GGG TTT GGG ACA GAC TTC ACC CTC	720

	241	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	256
	721	ACC	ATT	AGC	AGC	CTG	CAG	GCT	GAA	GAT	GTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	768
5	257	Q	Y	F	S	Y	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	272
	769	CAA	TAT	TTT	AGC	TAT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGA	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	816
	273	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	A	V	F	A	A	288
	817	ATA	AAA	CGT	ACT	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	GCT	GTC	TTC	GCG	GCC	864
10	289	A	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	304
	865	GCA	GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCA	TGC	912
	305	G	G	G	S	S	G	G	G	S	G	G	Q	P	R	E	P	320
15	913	GGA	GGA	GGA	AGT	AGC	GGA	GGA	GGA	TCA	GGA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	960
	321	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	336
	961	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	1008
20	337	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	352
	1009	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	1056
	353	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	368
	1057	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	1104
25	369	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	384
	1105	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAT	AGC	AAG	CTC	1152
	385	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	400
30	1153	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	1200
	401	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	416
	1201	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	1248
35	417	L	S	G	G	G	T	G	G	G	S	T	S	E	E	T	432	
	1249	CTG	TCC	GGA	GGT	GGC	GGT	ACC	GGA	GGT	GGG	TCT	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	1296
	433	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	448
	1297	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	1344
40	449	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	464
	1345	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	1392
	465	R	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	480
	1393	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	1440
45	481	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	496
	1441	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	1488
	497	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	512
50	1489	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	1536
	513	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	528
	1537	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	1584
55	529	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	544
	1585	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	1632
	545	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	R	560
60	1633	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	1680
	561	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	576
	1681	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	1728
65	577	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	592
	1729	CAA	GGG	GGG	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	1776

593 V T N E H L I D M D H E A S F F 608
1777 GTA ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT GAA GCC AGT TTT TTC 1824

5 609 G A F L V G * 615
1825 GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA 1845

10

Merkmale Konstrukt A:

Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

15 Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes OS4 (spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP): NT 58-822, AA 20-274

Sequenz des Linkers 1 (L1) Zwischen scFv und Immunoglobulin-CH3 Domäne:
NT 823-942, AA 275-314

20 Sequenz der Immunoglobulin-CH3 Domäne: NT 943-1254, AA 315-418

Sequenz des Linkers 2 zwischen Ig CH3 Domäne und TRAIL: NT 1254-1281, AA 419-427

25 Sequenz des humanen TRAIL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, ab AA 95-281 des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): NT 1282-1842, AA 428-614

Stop Kodon: NT 1843-1845.

30

35

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMAIZE

AZ#

Anmeldernummer:

5 Sequenzbeschreibung 2: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1443) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-480) eines erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMAIZE am Beispiel von TRAIL-AMAIZE(OS4) (Konstrukt B).

10	1 M D W T W R V F C L L A V A P G 1 ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT GGG	16 48
15	17 A H S Q V Q L V Q S G A E V K K 49 GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA	32 96
20	33 P G A S V K V S C K T S R Y T F 97 CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA ACT AGT AGA TAC ACC TTC	48 144
25	49 T E Y T I H W V R Q A P G Q R L 145 ACT GAA TAC ACC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG	64 192
30	65 E W I G G I N P N N G I P N Y N 193 GAG TGG ATA GGA GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT ATT CCT AAC TAC AAC	80 240
35	81 Q K F K G R V T I T V D T S A S 241 CAG AAG TTC AAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GTA GAC ACC TCT GCC AGC	96 288
40	97 T A Y M E L S S L R S E D T A V 289 ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC	112 336
45	113 Y Y C A R R R I A Y G Y D E G H 337 TAC TAC TGC GCC AGA AGA AGA ATC GCC TAT GGT TAC GAC GAG GGC CAT	128 384
50	129 A M D Y W G Q G T L V T V S S A 385 GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA GCC	144 432
55	145 S T K G P K L E E G E F S E A R 433 TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC	160 480
60	161 V D I V M T Q S P D S L A V S L 481 GTA GAC ATT GTG ATG ACC CAA TCT CCA GAC TCT TTG GCT GTG TCT CTA	176 528
65	177 G E R A T I N C K S S Q S L L Y 529 GGG GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT	192 576
70	193 S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G 577 TCT AGA AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA	208 624
75	209 Q P P K L L I F W A S T R E S G 625 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TTT TGG GCT AGC ACT AGG GAA TCT GGG	224 672
80	225 V P D R F S G S G F G T D F T L 673 GTA CCT GAT AGG TTC AGT GGC AGT GGG TTT GGG ACA GAC TTC ACC CTC	240 720
85	241 T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q 721 ACC ATT AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG	256 768
90	257 Q Y F S Y P L T F G Q G T K V E 769 CAA TAT TTT AGC TAT CCG CTC ACG TTC GGA CAA GGG ACC AAG GTG GAA	272 816

273	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	A	V	F	A	A	288	
817	ATA	AAA	CGT	ACT	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	GCT	GTC	TTC	GCG	GCC	864	
5	289	A	V	E	L	E	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	304	
	865	GCA	GTT	GAG	CTC	GAG	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	912
10	305	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	320
	913	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	960
15	321	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	S	336
	961	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	1008
20	337	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	352
	1009	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	1056
25	353	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	368
	1057	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	1104
30	369	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	384
	1105	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	1152
35	385	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	400
	1153	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	1200
40	401	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	416
	1201	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	1248
45	417	D	P	I	L	L	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	432
	1249	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	1296
50	433	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	448
	1297	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGG	ATA	TTT	GAG	1344
55	449	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	464
	1345	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	1392
60	465	I	D	M	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	480
	1393	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	1440
	481	*															481	
	1441	TAA															1443	

45 Merkmale Konstrukt B:

Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes OS4 spezifisch für
50 das Tumorstroma-Antigen FAP: NT 58-822, AA 20-274Sequenz des Linkers zwischen scFv und TRAIL-Fragment (AA 95-281): NT
823-879, AA 275-29355 Sequenz des humanen TRAIL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, AA 95-281
des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): NT 880-1440 AA 294-480

Stop Kodon: NT 1441-1443.

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMA1Ze

AZ#

Anmeldernummer:

5 Sequenzbeschreibung 3: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1386) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-461) eines erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMA1Ze am Beispiel von TRAIL-AMA1Ze (40) (Konstrukt C).

10	1 M D W T W R V F C L L A V A P G 16	48
	1 ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT GGG	
15	17 A H S Q V Q L V Q S G G G M V E 32	96
	49 GCC CAC AGC CAG GTA CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC ATG GTA GAG	
	33 P G G S L R L S C A A S G F T F 48	144
	97 CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC	
20	49 S N A W M S W V R Q A P G K G L 64	192
	145 AGT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG	
	65 E W V G R I K S K A G G G T A E 80	240
25	193 GAG TGG GTT GGC CGT ATA AAA AGC AAA GCT GGT GGT GGG ACA CCA GAG	
	81 Y A A P V K G R F T I S R D D S 96	288
	241 TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA	
30	97 Q N T L Y L Q M N S L K T D D T 112	336
	289 CAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAC GAC ACA	
	113 A V Y Y C T T H V Y G A P R N W 128	384
	337 GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA CAT GTC TAC GGT GCC CCC CGG AAC TGG	
35	129 G Q G S L V T V S S A S T K G P 144	432
	385 GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA	
	145 K L E E G E F S E A R V Q S V L 160	480
40	433 AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG TCT GTG TTG	
	161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I 176	528
	481 ACT CAG CCG CCC TCA GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC	
45	177 S C S G S S S N I G N N Y V S W 192	576
	529 TCC TGC TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATT GGA AAT AAT TAT GTC TCC TGG	
	193 Y V Q L P G T A P K L L I Y D N 208	624
	577 TAC GTT CAA CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT	
50	209 N K R F S G V P D R F S G S K S 224	672
	625 AAT AAG CGA TTC TCA GGA GTT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT	
	225 G T S A T L G I T G L Q T G D E 240	720
55	673 GGC ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGG CTC CAG ACT GGG GAC GAG	
	241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V 256	768
	721 GCC GAT TAT TAC TGC GGA GCA TGG GAT GGC AGC CTG CGT GAA GCG GTA	
60	257 F G G G T K V T V L G A A A V E 272	816
	769 TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA GTT GAG	

273	L	E	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	288	
817	CTC	GAG	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	864	
5	289	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	304	
	865	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	912	
	305	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	320	
10	913	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	960	
	321	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	E	336	
	961	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GCG	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	1008	
15	337	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	R	N	352	
	1009	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	1056	
	353	E	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	368	
	1057	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	1104	
20	369	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	N	D	384	
	1105	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	1152	
	385	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	400	
25	1153	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	1200
	401	L	L	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	D	A	416	
	1201	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	1248	
30	417	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	432	
	1249	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	1296	
	433	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	448	
	1297	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	1344	
35	449	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	*	462		
	1345	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	TAA		1386	

40 **Merkmale Konstrukt C:**

Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für
45 das Tumorstroma-Antigen FAP: NT 58-801, AA 20-267

Sequenz des Linkers zwischen scFv und TRAIL-Fragment (AA 95-281): NT
802-822, AA 268-274

50 Sequenz des humanen TRAIL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, AA 95-281
des natürlichen, humanen TRAIL Moleküls): NT 823-1383 AA 275-461

Stop Kodon: NT 1384-1386.

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMAIZE

AZ#

Anmeldernummer:

5 Sequenzbeschreibung 4: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1254) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-417) eines erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMAIZE am Beispiel von FasL-AMAIZE(40) (Konstrukt D).

10	1 M D W T W R V F C L L A V A P G	16
	1 ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT GGG	48
15	17 A H S Q V Q L V Q S G G G M V E	32
	49 GCC CAC AGC CAG GTA CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC ATG GTA GAG	96
	33 P G G S L R L S C A A S G F T F	48
	97 CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC	144
20	49 S N A W M S W V R Q A P G K G L	64
	145 AGT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG	192
	65 E W V G R I K S K A G G G T A E	80
	193 GAG TGG GTT GGC CGT ATA AAA AGC AAA GCT GGT GGT GGG ACA GCA GAG	240
25	81 Y A A P V K G R F T I S R D D S	96
	241 TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA	288
30	97 Q N T L Y L Q M N S L K T D D T	112
	289 CAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAC GAC ACA	336
	113 A V Y Y C T T H V Y G A P R N W	128
	337 GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA CAT GTC TAC GGT GCC CCC CGG AAC TGG	384
35	129 G Q G S L V T V S S A S T K G P	144
	385 GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA	432
	145 K L E E G E F S E A R V Q S V L	160
40	433 AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG TCT GTG TTG	480
	161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I	176
	481 ACT CAG CCG CCC TCA GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC	528
45	177 S C S G S S S N I G N N Y V S W	192
	529 TCC TGC TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATT GGA AAT AAT TAT GTC TCC TGG	576
	193 Y V Q L P G T A P K L L I Y D N	208
	577 TAC GTT CAA CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT	624
50	209 N K R F S G V P D R F S G S K S	224
	625 AAT AAG CGA TTC TCA GGA GTT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT	672
	225 G T S A T L G I T G L Q T G D E	240
55	673 GGC ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGG CTC CAG ACT GGG GAC GAG	720
	241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V	256
	721 GCC GAT TAT TAC TGC GGA GCA TGG GAT GGC AGC CTG CGT GAA GCG GTA	768
60	257 F G G G T K V T V L G A A A V E	272
	769 TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA GTT GAG	816

	273	L	E	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	288
	817	CTC	GAG	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	864
5	289	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	304
	865	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	912
	305	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	320
10	913	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	960
	321	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	336
	961	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	1008
15	337	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	S	352
	1009	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	1056
	353	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	S	Y	368
	1057	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	1104
20	369	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	384
	1105	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	1152
	385	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	400
25	1153	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	1200
	401	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	416
	1201	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	1248
30	417	L	*															418
	1249	CTC	TAA															1254

Merkmale Konstrukt D:

35 Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: NT 58-801, AA 20-267

40 Sequenz des Linkers zwischen scFv und FasL-Fragment (AA 139-281): NT 802-822, AA 268-274

Sequenz des humanen FasL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): NT 823-1251, AA 275-417

45 Stop Kodon: NT 1552-1554.

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMAIZE

AZ#

Anmeldernummer:

5 Sequenzbeschreibung 5: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1299) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-432) eines erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMAIZE am Beispiel von FasL-AMAIZE(OS4) (Konstrukt E).

10	1 M D W T W R V F C L L A V A P G 1 ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT GGG	16 48
15	17 A H S Q V Q L V Q S G A E V K K 49 GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA	32 96
20	33 P G A S V K V S C K T S R Y T F 97 CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA ACT AGT AGA TAC ACC TTC	48 144
25	49 T E Y T I H W V R Q A P G Q R L 145 ACT GAA TAC ACC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG	64 192
30	65 E W I G G I N P N N G I P N Y N 193 GAG TGG ATA GGA GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT ATT CCT AAC TAC AAC	80 240
35	81 Q K F K G R V T I T V D T S A S 241 CAG AAG TTC AAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GTA GAC ACC TCT GCC AGC	96 288
40	97 T A Y M E L S S L R S E D T A V 289 ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC	112 336
45	113 Y Y C A R R R I A Y G Y D E G H 337 TAC TAC TGC GCC AGA AGA AGA ATC GCC TAT GGT TAC GAC GAG GGC CAT	128 384
50	129 A M D Y W G Q G T L V T V S S A 385 GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA GCC	144 432
55	145 S T K G P K L E E G E F S E A R 433 TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC	160 480
60	161 V D I V M T Q S P D S L A V S L 481 GTA GAC ATT GTG ATG ACC CAA TCT CCA GAC TCT TTG GCT GTG TCT CTA	176 528
65	177 G E R A T I N C K S S Q S L L Y 529 GGG GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT	192 576
70	193 S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G 577 TCT AGA AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA	208 624
75	209 Q P P K L L I F W A S T R E S G 625 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TTT TGG GCT AGC ACT AGG GAA TCT GGG	224 672
80	225 V P D R F S G S G F G T D F T L 673 GTA CCT GAT AGG TTC AGT GGC AGT GGG TTT GGG ACA GAC TTC ACC CTC	240 720
85	241 T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q 721 ACC ATT AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG	256 768
90	257 Q Y F S Y P L T F G Q G T K V E 769 CAA TAT TTT AGC TAT CCG CTC ACG TTC GGA CAA GGG ACC AAG GTG GAA	272 816

273	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	A	V	F	A	A	288	
817	ATA	AAA	CGT	ACT	GTC	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	GCT	GTC	TTC	GCG	GCC	864	
5	289	A	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	S	304
	865	GCA	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	912
	305	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	320
10	913	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	960
	321	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	E	336
	961	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	1008
15	337	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	S	352
	1009	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	1056
	353	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	S	K	368
	1057	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	1104
20	369	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	384
	1105	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	1152
	385	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	400
25	1153	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	1200
	401	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	416
	1201	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	1248
30	417	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	432
	1249	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	1296
	433	*															433	
	1297	TAA															1299	

35

Merkmale:

Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

40 Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes OS4 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: NT 58-822, AA 20-274

Sequenz des Linkers zwischen scFv und FasL-Fragment (AA 139-281): NT 823-867, AA 275-289

45 Sequenz des humanen FasL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): NT 868-1296 AA 290-432

50 Stop Kodon: NT 1441-1443.

Sequenzprotokoll zu Patentanmeldung AMA1Ze

AZ#

Anmeldernummer:

5 Sequenzbeschreibung 6: Kodierende DNA Sequenz (unten, nur kodierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1278) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-425) eines erfindungsgemäßen Antikörper-Zytokin-Fusionsproteins AMA1Ze am Beispiel von FasL-AMA1Ze (40-Flag) (Konstrukt F).

10

1	M	D	W	T	W	R	V	F	C	L	L	A	V	A	P	G	16
1	ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	CGC	GTG	TTT	TGC	CTG	CTC	GCC	GTG	GCT	CCT	GGG	48

15

17	A	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	M	V	E	32
49	GCC	CAC	AGC	CAG	GTA	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGG	GGC	ATG	GTA	GAG	96

33	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	48
97	CCT	GGG	GGG	TCC	CTT	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGG	TTC	ACT	TTC	144

20

49	S	N	A	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	64
145	AGT	AAT	GCC	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	192

65	E	W	V	G	R	I	K	S	K	A	G	G	G	T	A	E	80
193	GAG	TGG	GTT	GGC	CGT	ATA	AAA	AGC	AAA	GCT	GGT	GGT	GGG	ACA	GCA	GAG	240

25

81	Y	A	A	P	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	96
241	TAC	GCT	GCA	CCC	GTG	AAA	GGC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	288

30

97	Q	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	K	T	D	D	T	112
289	CAA	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AAA	ACC	GAC	GAC	ACA	336

113	A	V	Y	Y	C	T	T	H	V	Y	G	A	P	R	N	W	128
337	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	ACC	ACA	CAT	GTC	TAC	GGT	GCC	CCC	CGG	AAC	TGG	384

35

129	G	Q	G	S	L	V	T	V	S	S	A	S	T	K	G	P	144
385	GGC	CAG	GGA	TCC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	432

40

145	K	L	E	E	G	E	F	S	E	A	R	V	Q	S	V	L	160
433	AAG	CTT	GAA	GAA	GGT	GAA	TTT	TCA	GAA	GCA	CGC	GTA	CAG	TCT	GTG	TTG	480

161	T	Q	P	P	S	V	S	A	A	P	G	Q	K	V	T	I	176
481	ACT	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GCG	GCC	CCA	GGG	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC	528

45

177	S	C	S	G	S	S	S	N	I	G	N	N	Y	V	S	W	192
529	TCC	TGC	TCT	GGA	AGC	AGC	TCC	AAC	ATT	GGA	AAT	AAT	TAT	GTC	TCC	TGG	576

193	Y	V	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	208
577	TAC	GTT	CAA	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATT	TAT	GAC	AAT	624

50

209	N	K	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	224
625	AAT	AAG	CGA	TTC	TCA	GGA	GTT	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	672

225	G	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	240
673	GGC	ACG	TCA	GCC	ACC	CTG	GGC	ATC	ACC	GGG	CTC	CAG	ACT	GGG	GAC	GAG	720

241	A	D	Y	Y	C	G	A	W	D	G	S	L	R	E	A	V	256
721	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC	GGA	GCA	TGG	GAT	GGC	AGC	CTG	CGT	GAA	GCG	GTA	768

60

257	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	D	Y	K	D	D	272
769	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	816

273	D	D	K	A	A	A	V	E	L	E	E	K	K	E	L	R	288	
817	GAC	GAT	AAA	GCG	GCC	GCA	GTT	GAG	CTC	GAG	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	864	
5	289	K	V	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	304
	865	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	912
	305	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	320
10	913	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	960
	321	K	K	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	336
	961	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	1008
15	337	S	K	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	352
	1009	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	1056
	353	H	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	368
	1057	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	1104
20	369	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	384
	1105	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	1152
	385	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	400
25	1153	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	1200
	401	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	416
	1201	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	1248
30	417	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	*						426	
	1249	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TAA						1278	

Merkmale Konstrukt F:

35 Leitpeptidsequenz: NT 1-57, AA 1-19

Sequenz des Einzelketten (scFv)-Antikörperfragmentes 40 spezifisch für das Tumorstroma-Antigen FAP: NT 58-801, AA 20-267

40 Sequenz des Flag-tag zwischen scFv und Linker-Sequenz: NT 802-825, AA 268-275

Sequenz von des Linkers zwischen Flag-tag und FasL-Fragment (AA 139-281): NT 826-846, AA 276-282

45 Sequenz des humanen FasL Fragmentes (extrazelluläre Domäne, AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): NT 847-1275, AA 283-425

Stop Kodon: NT 1276-1278.

50

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/022680 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/62,
C07K 14/52, 19/00, 16/28, A61K 39/395, 38/19

Harald [DE/DE]; Sonnenbühl 2, 70771 Leinfelden-Echterdingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10364

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOOSMAYER, Dieter [DE/DE]; Zechliner Strasse 6, 13359 Berlin (DE). WÜEST, Thomas [CH/CH]; Rosenstrasse 46, CH-8953 Dietikon (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. September 2001 (07.09.2001)

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstr. 8, 80333 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

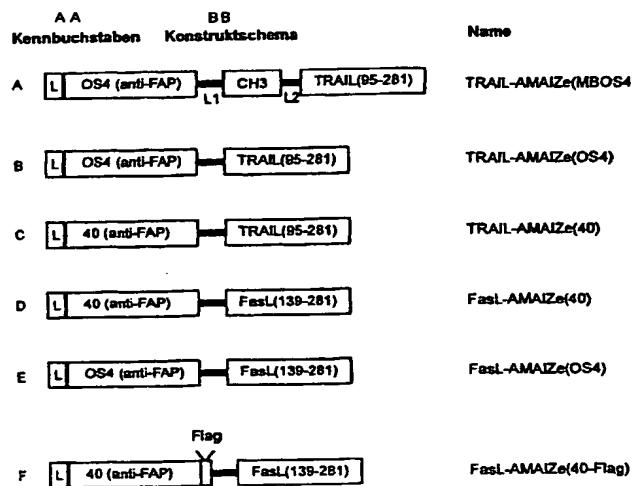
100 45 591.3 15. September 2000 (15.09.2000) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: PFIZENMAIER, Klaus [DE/DE]; Seehausstrasse 7, 75233 Tiefenbronn (DE). WAJANT,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SITE-SPECIFIC, ANTIBODY-MEDIATED ACTIVATION OF PROAPOPTOTIC CYTOKINE: AMAICE (ANTIBODY-MEDIATED APOPTOSIS INDUCING CYTOKINE)

(54) Bezeichnung: ORTSSPEZIFISCHE, ANTIKÖRPERVERMITTELTE AKTIVIERUNG PROAPOPTOTISCHER ZYTOKINE: AMAIZe (ANTIBODY-MEDIATED APOPTOSIS INDUCING ZYTOKINE)



AA...DESIGNATION LETTERS BB...CONSTRUCT SCHEMA

WO 02/022680 A3

(57) Abstract: The invention relates to antibody-cytokine fusion proteins having proapoptotic and immunomodulating properties, however, a priori having a specific bioactivity in the cytokine portion that is very low or limited to certain receptor subtypes. These reagents first deploy the full biological action over the corresponding cytokine receptor(s) after an antibody-mediated binding of the fusion protein to a specific, cell membrane-expressed target molecule. By appropriately selecting the antibody specificity, the cytokine activity is directed at the tissue to be treated, e.g. tumor tissue, and a therapeutic agent can be produced, which is specifically matched to/optimized for the respective indication/tumor entity.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 12. September 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine mit proapoptotischen und immunmodulierenden Eigenschaften, aber a priori sehr niedriger bzw. auf bestimmte Rezeptorsubtypen eingeschränkter spezifischer Bioaktivität im Zytokinanteil. Diese Reagenzien entfalten erst nach Antikörper-vermittelter Bindung des Fusionsproteins an ein spezifisches, zellmembranexprimierte Zielmolekül die volle biologische Wirkung über den/die entsprechenden Zytokinrezeptoren. Durch geeignete Auswahl der Antikörperspezifität wird die Zytokin-Aktivität auf das zu behandelnde Gewebe, z.B. Tumorgewebe, gerichtet und es kann ein auf die jeweilige Indikation/Tumorentität spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/10364A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/62 C07K14/52 C07K19/00 C07K16/28 A61K39/395
A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIANG J: "TARGETING CYTOKINES TO TUMORS TO INDUCE ACTIVE ANTITUMOR IMMUNE RESPONSES BY RECOMBINANT FUSION PROTEINS" HUMAN ANTIBODIES, AMSTERDAM, NL, vol. 9, 1996, pages 23-36, XP000940526 ISSN: 1093-2607 see whole document	1-3, 5, 6, 8-18
X	GILLIES S D ET AL: "Biological activity and in vivo clearance of antitumor antibody/cytokine fusion proteins" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 4, no. 3, May 1993 (1993-05), pages 230-235, XP002107032 ISSN: 1043-1802 see whole document	1-3, 5, 6, 8-18

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

8 March 2002

02/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grosskopf, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 650 150 A (GILLIES STEPHEN D) 22 July 1997 (1997-07-22) Example 10, claims	1-3,5,6, 8-18
X	XIANG J ET AL: "Genetic engineering of a recombinant fusion possessing anti-tumor F(ab?)2 and tumor necrosis factor" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 53, no. 1, 28 February 1997 (1997-02-28), pages 3-12, XP004094618 ISSN: 0168-1656 see whole document	1-3,5,6, 8-18
X	WO 99 43713 A (LEXIGEN PHARM CORP) 2 September 1999 (1999-09-02) see claims	1,2,5, 8-18
X	WO 99 25834 A (GENENTECH INC) 27 May 1999 (1999-05-27) claim 19	1,2
X	WO 00 26244 A (LENARDO MICHAEL J ;US HEALTH (US); JIANG DI (US); WANG JIN (US)) 11 May 2000 (2000-05-11) page 46, line 15 -page 47, line 9	1-6
A	WILEY S R ET AL: "IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW MEMBER OF THE TNF FAMILY THAT INDUCES APOPTOSIS" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 3, no. 6, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 673-682, XP000672297 ISSN: 1074-7613	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/10364

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although the Claim No. 16 refers to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: **Claims Nos. 1-18 (all in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Field 1.2

Claims Nos. 1-18 (all in part)

The polypeptide of Claim No. 1 contains, in addition to two, albeit broadly but nevertheless technically defined sections, namely a fragment with a biological activity and an antibody fragment, two additional features that either constitute no limitation of the scope of protection (i.e. the undefined peptide linker) or are incomprehensibly or functionally formulated ("whereby the polypeptide is biologically inactive or limited without site-specific and/or selective binding of the section (3) to the target molecule"). If every single expression of the last-mentioned feature is already unclear, then the feature, in its entirety, is insufficiently defined and is unfit to be defined as a "product" to such an extent that a meaningful search with regard to this feature was not possible to conduct, i.e. the search had to be limited to the polypeptides insofar as they are defined by their actual constituents.

The applicant is therefore advised that patent claims or portions of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also, as a rule, does not carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the event that the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the event that the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/10364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5650150	A 22-07-1997	AU 660297 B2 AU 9059691 A CA 2095836 A1 EP 1149913 A1 EP 0574395 A1 JP 9506761 T JP 2001095566 A WO 9208495 A1		22-06-1995 11-06-1992 10-05-1992 31-10-2001 22-12-1993 08-07-1997 10-04-2001 29-05-1992
WO 9943713	A 02-09-1999	AU 2784299 A BR 9908226 A CN 1291995 T EP 1060194 A1 HU 0100813 A2 NO 20004218 A PL 342497 A1 WO 9943713 A1		15-09-1999 24-10-2000 18-04-2001 20-12-2000 28-06-2001 24-10-2000 04-06-2001 02-09-1999
WO 9925834	A 27-05-1999	AU 1418099 A EP 1032672 A1 JP 2001523459 T WO 9925834 A1		07-06-1999 06-09-2000 27-11-2001 27-05-1999
WO 0026244	A 11-05-2000	AU 1467000 A WO 0026244 A2		22-05-2000 11-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10364

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/62 C07K14/52 C07K19/00 C07K16/28 A61K39/395
 A61K38/19

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	XIANG J: "TARGETING CYTOKINES TO TUMORS TO INDUCE ACTIVE ANTITUMOR IMMUNE RESPONSES BY RECOMBINANT FUSION PROTEINS" HUMAN ANTIBODIES, AMSTERDAM, NL, Bd. 9, 1996, Seiten 23-36, XP000940526 ISSN: 1093-2607 see whole document	1-3,5,6, 8-18
X	GILLIES S D ET AL: "Biological activity and in vivo clearance of antitumor antibody/cytokine fusion proteins" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 4, Nr. 3, Mai 1993 (1993-05), Seiten 230-235, XP002107032 ISSN: 1043-1802 see whole document	1-3,5,6, 8-18

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. März 2002	02/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Grosskopf, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10364

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 650 150 A (GILLIES STEPHEN D) 22. Juli 1997 (1997-07-22) Example 10, claims ____	1-3, 5, 6, 8-18
X	XIANG J ET AL: "Genetic engineering of a recombinant fusion possessing anti-tumor F(ab?)2 and tumor necrosis factor" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 53, Nr. 1, 28. Februar 1997 (1997-02-28), Seiten 3-12, XP004094618 ISSN: 0168-1656 see whole document ____	1-3, 5, 6, 8-18
X	WO 99 43713 A (LEXIGEN PHARM CORP) 2. September 1999 (1999-09-02) see claims ____	1, 2, 5, 8-18
X	WO 99 25834 A (GENENTECH INC) 27. Mai 1999 (1999-05-27) Anspruch 19 ____	1, 2
X	WO 00 26244 A (LENARDO MICHAEL J ;US HEALTH (US); JIANG DI (US); WANG JIN (US)) 11. Mai 2000 (2000-05-11) Seite 46, Zeile 15 -Seite 47, Zeile 9 ____	1-6
A	WILEY S R ET AL: "IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW MEMBER OF THE TNF FAMILY THAT INDUCES APOPTOSIS" IMMUNITY, CELL PRESS, US, Bd. 3, Nr. 6, 1. Dezember 1995 (1995-12-01), Seiten 673-682, XP000672297 ISSN: 1074-7613 ____	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTinternationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10364**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Obwohl der Anspruch 16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. 1-18 (alle teilweise) weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-18 (alle teilweise)

Das Polypeptid des Anspruchs 1 enthält neben zwei, wenn auch breit aber doch technisch definierten Abschnitten, nämlich einem Fragment mit biologischer Aktivität und einem Antikörperfragment zwei weitere Merkmale, die entweder keine Einschränkung des Schutzmanges darstellen (d.h. den undefinierten Peptidlinker) oder unverständlich bzw. aufgabenhaft formuliert sind ("wobei das Polypeptid ohne ortsspezifische und/oder selektive Bindung des Abschnitts (3) an das Zielmolekül biologisch inaktiv bzw. eingeschränkt ist"). Ist jeder einzelne Ausdruck des letztgenannten Merkmals für sich schon unklar, so ist das Merkmal in seiner Gesamtheit so unzureichend definiert und ungeignet ein "Produkt" zu definieren, dass eine sinnvolle Recherche in Bezug auf dieses Merkmal nicht möglich war, d.h. die Recherche musste sich auf die Polypeptide beschränken insofern sie durch ihre tatsächlichen Bestandteile definiert sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10364

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5650150	A	22-07-1997	AU	660297 B2		22-06-1995
			AU	9059691 A		11-06-1992
			CA	2095836 A1		10-05-1992
			EP	1149913 A1		31-10-2001
			EP	0574395 A1		22-12-1993
			JP	9506761 T		08-07-1997
			JP	2001095566 A		10-04-2001
			WO	9208495 A1		29-05-1992
WO 9943713	A	02-09-1999	AU	2784299 A		15-09-1999
			BR	9908226 A		24-10-2000
			CN	1291995 T		18-04-2001
			EP	1060194 A1		20-12-2000
			HU	0100813 A2		28-06-2001
			NO	20004218 A		24-10-2000
			PL	342497 A1		04-06-2001
			WO	9943713 A1		02-09-1999
WO 9925834	A	27-05-1999	AU	1418099 A		07-06-1999
			EP	1032672 A1		06-09-2000
			JP	2001523459 T		27-11-2001
			WO	9925834 A1		27-05-1999
WO 0026244	A	11-05-2000	AU	1467000 A		22-05-2000
			WO	0026244 A2		11-05-2000